

LITERATURE REVIEW

Pharmacokinetics and adverse effects of doxycycline in the treatment of Ehrlichiosis: theoretical foundations for clinical trials in canines

Farmacocinética y efectos adversos de la doxiciclina en el tratamiento de la Ehrlichiosis: fundamentos teóricos para ensayos clínicos en caninos

Santiago Monsalve B^{1*} M.Sc, Vanessa Gallego L² QF,
Victor Manuel Molina¹ M.Sc, Juan Rodas G³ Ph.D.

¹Corporación Universitaria Lasallista (CUL), Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria – GIVET, Carrera 51 Nro. 18-62, Caldas, Colombia.

² Corporación Universitaria Lasallista (CUL), Facultad de Ingenierías, Grupo de Investigación en Alimentos – GRIAL, Carrera 51 Nro. 18-62, Caldas, Colombia. ³Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias – CENTAURO, Calle 70 Nro. 52-21, Medellín, Colombia. *Correspondence: samonsalve@lasallistadocentes.edu.co

Received: September 2016; Accepted: February 2017.

ABSTRACT

Ehrlichia canis is the causative bacterium of canine monocytic ehrlichiosis (CME), a disease of global importance in veterinary and human medicine. Several studies have addressed the therapeutic efficacy of tetracycline hydrochloride and doxycycline hyclate (HD) for the treatment of CME, however the results are still controversial. Doxycycline is the treatment of choice for canine monocytic ehrlichiosis (CME), a well characterized disease that can serve as a model for research in diseases of the Rickettsial order and tick-borne zoonoses. Although the pharmacokinetics and efficacy of the treatment in the acute and subclinical CME phases have been known for decades, some results also indicate that *Ehrlichia canis* may persist in clinically normal dogs, even after an extensive treatment regimen. The purpose of this review is to (major delve into/further investigate) the pharmacokinetics and side effects of doxycycline in the treatment of canine ehrlichiosis.

Keywords: Blood chemistry, *Ehrlichia canis*, hematology, pharmacokinetics, tetracycline (Source: CAB).

RESUMEN

Ehrlichia canis es la bacteria causante de la Ehrlichiosis monocítica canina (EMC), una enfermedad de importancia global en la medicina veterinaria y humana. Varios estudios han abordado la eficacia terapéutica de hidrocloreuro de tetraciclina e hiclato de doxiciclina (HD) para el tratamiento de la EMC, sin embargo los resultados obtenidos siguen siendo controvertidos. La doxiciclina es el tratamiento de elección para la EMC, enfermedad bien caracterizada que puede servir como modelo para las investigaciones en el estudio de las enfermedades del orden de los *Rickettsiales* y las zoonosis transmitidas por garrapatas. Aunque desde décadas atrás se conoce su farmacocinética y la eficacia en el tratamiento de la EMC en fase aguda y subclínica, algunos resultados también indican que *Ehrlichia canis* puede persistir en perros clínicamente normales, incluso después de un amplio régimen de tratamiento. El propósito de esta revisión es hacer un acercamiento referente a la farmacocinética y los efectos adversos de la doxiciclina en el tratamiento de la EMC.

Palabras clave: *Ehrlichia canis*, farmacocinética, hematología, química sanguínea, tetraciclina (Fuente: CAB).

INTRODUCTION

Doxycycline is a bacteriostatic antibiotic member of the tetracycline family that has been used in systemic pathways in human medicine and domestic animals for over 40 years (1-3). Due to its higher liposolubility compared to other tetracyclines, doxycycline has a greater distribution volume, which allows for better tissue penetration, despite its high binding percentage to plasma proteins (80% - 90%) (3- 5). This antibiotic is used in the treatment of multiple canine infections, including those caused by *Ehrlichia canis*, where the regime is recommended for a period of 28 days (4-6). This review presents the pharmacokinetic aspects and possible adverse effects related to the use of doxycycline. The issue addressed is important in the execution of projects related to the treatment of CME with different pharmaceutical presentations of doxycycline.

PHARMACOLOGICAL OVERVIEW

Doxycycline is an amphoteric synthetic compound from the tetracycline group which degrades in distinctly alkaline or acidic media (7,8). Like other tetracyclines, it is a broad spectrum bacteriostatic drug, that includes action on microorganisms of the order Rickettsiales, Mycoplasmas and Chlamidiales (8). In addition, it is used prophylactically against *Plasmodium spp.*, the Protozoa that causes malaria (9).

Tetracyclines enter microorganisms either by passive diffusion, through hydrophilic channels formed by porins, or by energy-dependent active transport processes. Within the bacterial cell, they bind to the 30s ribosomal subunit thereby blocking the binding of aminoacyl-tRNA to the acceptor site of the mRNA ribosomal complex, impeding the protein transcription process (8-11). Some side effects have been reported in experimental studies of innovative doxycycline formulations (12). However, although tetracyclines are considered safe drugs, they are not exempt from undesirable effects in humans and animals (8), and their toxicity has been reported in different biomodels when administered intravenously (Table 1).

In general terms, these effects are related to:

- Irritating capacity causing digestive disorders, mainly vomiting (6).
- Aseptic abscess after parenteral application (11).
- Alteration of intestinal microflora (13,14)
- Calcium chelation (1).
- Possible toxic effects on renal and hepatic cells on high doses (1)

INTRODUCCIÓN

La doxiciclina es un antibiótico bacteriostático miembro de la familia de las tetraciclinas que se ha utilizado por vías sistémicas en medicina humana y animales domésticos desde hace más de 40 años (1-3). Debido a su mayor liposolubilidad en comparación con otras tetraciclinas, la doxiciclina posee un mayor volumen de distribución que le permite una mejor penetración en los tejidos a pesar de su alto porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas (80% - 90%) (3-5). Este antibiótico se emplea en el tratamiento de múltiples infecciones caninas, incluidas las causadas por *Ehrlichia canis*, donde se recomienda un régimen por un periodo de 28 días (4-6). Esta revisión, presenta los aspectos farmacocinéticos y posibles efectos adversos relacionados con el uso de la doxiciclina. La temática abordada es importante en la ejecución de proyectos relacionados con el tratamiento de EMC con distintas presentaciones farmacéuticas de doxiciclina.

GENERALIDADES FARMACOLÓGICAS

La doxiciclina, es un compuesto sintético anfotérico del grupo de las tetraciclinas que se degrada en medios marcadamente alcalinos o ácidos (7,8). Como las demás tetraciclinas, es un fármaco bacteriostático con un amplio espectro de acción, incluyendo microorganismos del orden Rickettsiales, Mycoplasmas y Chlamidiales (8). Adicionalmente, se usa profilácticamente frente a *Plasmodium spp.*, protozoos causantes de la malaria (9).

Las tetraciclinas ingresan a los microorganismos bien mediante difusión pasiva, a través de canales hidrófilos formados por porinas, o por procesos de transporte activo dependiente de energía. En el interior de la célula bacteriana, se unen a la subunidad ribosomal 30s y de esta forma bloquean la unión del aminoacil-tRNA al sitio aceptor del complejo ribosomal del mRNA, impidiendo así el proceso de transcripción proteica (8-11). En los estudios experimentales de formulaciones innovadoras de doxiciclina se han reportado algunos efectos adversos (12). Sin embargo, aunque las tetraciclinas son consideradas fármacos seguros, no están exentas de efectos indeseados en humanos y animales (8), y ha sido reportada su toxicidad en diferentes biomodelos cuando son administradas por vía intravenosa (Tabla 1).

En general, estos efectos están relacionados con:

- Capacidad irritante causando trastornos digestivos, principalmente el vómito (6).
- Abscesos asépticos después de una aplicación parenteral (11).

Table 1. Effects of intravenous doxycycline in domestic animals.

Intravenous doxycycline						
Used species	Symptoms	Clinical-pathological effects	Cause of death	Administered Dose	Year	Author
Bovines	Hypersalivation, decrease in muscle tone of the tongue, Dysphagia, dehydration, diarrhea, atrial fibrillation	Dystrophic multifocal calcification and necrosis of muscles, histiocytic and fibroblast infiltrations	Myocardial degeneration and sudden death	Aproximately between 50 and 60 mg/Kg	2004	Chiers K, et al (52)
Equines	Diarrhea and colitis, increased heart rate, increased heart rate	Muscle fasciculations	Fatal colitis, cardiac arrest.	Between 3 and 10 mg/Kg	1992	Riond JL, et al (53)
Felines and canines	Bradycardia, decrease in blood pressure	Abnormalities on the electrocardiogram	Cardiac Arrest	Not reported	1971	Scholken, et al (54)
Canines	Not reported	No effects	Not reported	1 mg/Kg given in 5 minutes	2003	Bidgood T, et al (36)
Canines	Tissue reactions in the puncture site	No effects	Not reported	10 mg/Kg	2012	Gutierrez L, et al (11)

In addition, the use of doxycycline is contraindicated in pregnant females because it is a teratogenic substance (8). In a study of 386 canine patients (with different etiologies) who received a mean dose of 16 mg / kg doxycycline per day, vomiting was reported in 18.3%, diarrhea in 7%, and anorexia in 2.5% of the canine patients studied (9).

EHRlichia CANIS AND THE EFFECTS OF DOXYCYCLINE IN THE TREATMENT

A total of 6 species within the genus Ehrlichia have been reported in humans and animals (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia mineirensis*, *Ehrlichia muris* and *Ehrlichia ruminantium*) based on serological and molecular evidence, however new members of the genus are continuously being Discovered (15).

CME is an infectious disease caused by the *Ehrlichia canis* bacterium, which is considered to be zoonotic (16,17) and emergent, transmitted mainly by the dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*) (18). The etiology of CME arises from infection of Gram-negative bacteria of the genus Ehrlichia (although gram staining is often not useful) classified within the order Rickettsiales and Anaplasmataceae family. (15) In both frequency and experimental studies, infection with acute disease and modification in hematological values by different agents of the Anaplasmataceae family (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *Anaplasma phagocytophilum*) in canine specimens and their detection in known vectors has been demonstrated (19-21).

The *Ehrlichia* genus comprises a group of intracellular, pleomorphic, often spheroid or ovoid species, which are established in monocytes, lymphocytes, neutrophils and platelets, producing

- c) Alteración de la microflora intestinal (13,14)
- d) Quelación del calcio (1).
- e) Posibles efectos tóxicos sobre células hepáticas y renales a altas dosis (1)

Además, el uso de doxiciclina está contraindicado en hembras gestantes por ser una sustancia teratogénica (8). En un estudio con 386 caninos enfermos (con etiologías diferentes) a los que se suministró una dosis media de doxiciclina de 16 mg/kg al día fue reportado vómito en el 18.3%, diarrea en el 7% y anorexia en el 2.5% de los pacientes caninos estudiados (9).

EHRlichia CANIS Y EFECTO DE DOXICICLINA EN EL TRATAMIENTO

Un total de 6 especies dentro del género Ehrlichia han sido reportadas en humanos y animales (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia mineirensis*, *Ehrlichia muris* y *Ehrlichia ruminantium*) basado en evidencia serológica y molecular, sin embargo nuevos miembros del género son continuamente descubiertos (15).

La EMC es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Ehrlichia canis*, considerada zoonótica (16,17) y emergente, transmitida principalmente por la garrapata del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) (18). La etiología de la EMC surge a raíz de la infección por bacterias Gram-negativas del género Ehrlichia (aunque las tinciones con gram no suelen ser útiles) clasificadas dentro del orden de los Rickettsiales y la familia Anaplasmataceae (15). Tanto en estudios de frecuencia y experimentales ha sido demostrada la infección con enfermedad aguda y modificación en los valores hematológicos por parte de diferentes agentes de la familia Anaplasmataceae (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma platys* y *Anaplasma*

intracytoplasmic morulae (22). Infection in the animal spreads via blood or lymphatic cells into infected mononuclear cells (23).

Hemogram. The *Ehrlichia canis* infection presents leukopenia, thrombocytopenia, anemia, hyperproteinemia, hyperglobulinemia, hypergammaglobulinemia and hypoalbuminemia (Figure 1) (22). After infected, canine patients may suffer from severe acute anemia, which is related to specific antibodies that adhere to molecules found naturally in the erythrocyte wall causing the activation of the cascade complement, resulting in intravascular lysis and opsonization of the Red blood cells in order to facilitate phagocytosis by monocytes in the liver and spleen (immune-mediated hemolytic anemia) (24,25).

Meningoencephalitis caused by *Ehrlichia canis* without modified hematological values has been reported in canine patients (26). Acute phase proteins (C-reactive protein) and some antioxidant markers (Haptoglobin and Paraoxonase-1) tend to change significantly in most dogs infected with *Ehrlichia canis* (27).

Studies in infected dogs show that treatment with doxycycline for 28 days restores erythrocyte, platelet, and hemoglobin levels (5,23).

phagocytophilum) en ejemplares caninos y de igual manera su detección en los vectores conocidos (19–21).

El género *Ehrlichia* comprende un grupo de especies de bacterias intracelulares, pleomórficas, con frecuencia esferoides u ovoides, que se establecen en monocitos, linfocitos, neutrófilos y plaquetas, produciendo mórulas intracitoplasmáticas (22). La infección dentro del animal se disemina vía sanguínea o linfática dentro de las células mononucleares infectadas (23).

Hemograma. La Infección con *Ehrlichia canis* cursa con cuadros de leucopenia, trombocitopenia, anemia, hiperproteinemia, hiperglobulinemia, hipergamaglobulinemia e hypoalbuminemia (Figura 1) (22). Luego de la infección, los pacientes caninos pueden sufrir anemia aguda grave la cual está relacionada con anticuerpos específicos para moléculas que se encuentran naturalmente en la pared de los eritrocitos provocando la activación de la cascada de complemento, resultando en la lisis intravascular y opsonización de los glóbulos rojos con el fin de facilitar la fagocitosis por parte de monocitos en el hígado y el bazo (anemia hemolítica inmunomediada) (24,25).

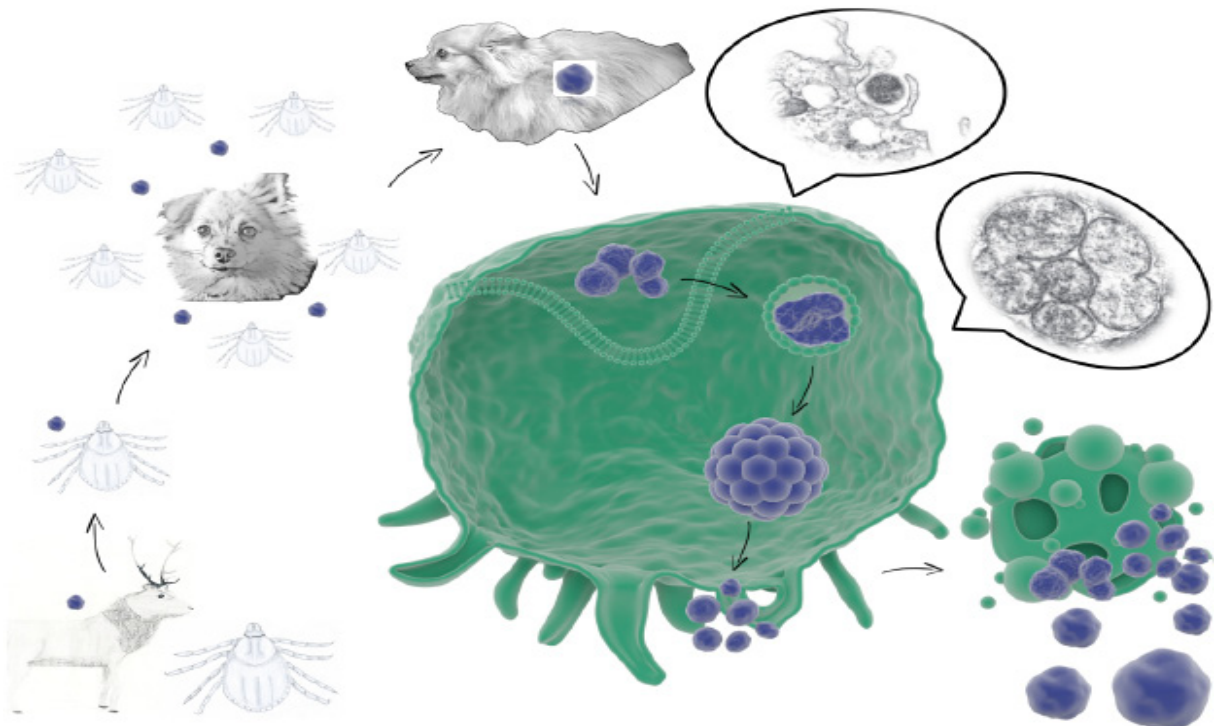


Figure 1. Tick stages can be potential vectors of the disease and transmit it to reservoirs. When canines have contact with the vectors (through the bite), by coexistence or accidental exposure with reservoirs, they acquire the disease. *Ehrlichia spp* enters the monocyte by endocytosis, forms a phagolysosoma, where it enters replication resulting in the conformation of the typical morula and by exocytosis the new bacteria come to circulation repeating the cycle. Adapted from Little et al (18); And Rikihisa (19).

Blood chemistry. The use of doxycycline, both in animals infected with *E. canis* and in healthy animals, showed a progressive decrease in serum creatinine concentration suggesting a nephroprotective effect (5).

Certain studies have described that at high doses, the use of doxycycline can lower the rate of glomerular filtration causing states of ischemia in the efferent arteriola, which may lead to an increase in serum creatinine values. One of the theories is the reduction of the oxidative stress, decreasing cytokine levels and inhibiting the activity of matrix metalloproteinases (5,30). The anti-inflammatory and immunomodulatory properties of doxycycline associated with these effects have been determined in different studies (31,32).

An oral dose of doxycycline close to 16 mg/kg/day was given throughout a study in 386 canines with CME. An increase (under normal species-level and dose-dependent levels) was reported in levels of alanine aminotransferase and alkaline phosphatase in 39.4% and 36.4% of the dogs studied, respectively (13). This may indicate that the drug not only causes alteration in filtration, as described by several authors, but could also lead to hepatic alterations due to its lipophilic characteristics and the extensive metabolism of the antibiotic (13).

IMMUNE SYSTEM

Globulins. Following the dose of 10 mg/kg doxycycline, an increase of α 2-globulins was reported in the treatment for *Ehrlichia canis*, whereas gamma-globulins show a statistically non-significant decrease, attributed to the low production of antibodies. After the intervention, an increase in the serum concentration of B-globulins was demonstrated, which could be related to an increase in B lymphocytes in subclinical or chronic disease (5,7).

T lymphocytes. During the treatment of CME, an increase in circulating cytotoxic T lymphocytes (CD3+ and CD8+) and lymph nodes was reported (33,34). However, other studies have shown that the doxycycline regimen decreases the cytotoxic T lymphocyte count. This effect may be related to the antimicrobial activity of doxycycline (5). However these cells may be responsible for immunopathological mechanisms caused by infection (35).

B lymphocytes. B (CD21+) lymphocytes increase after treatment. However, they later and gradually decrease to normal values.

Meningoencefalitis causada por *Ehrlichia canis* sin valores hematológicos modificados ha sido reportada en pacientes caninos (26). Se ha demostrado que proteínas de fase aguda (proteína C-reactiva) y algunos marcadores antioxidantes (Haptoglobina y paraoxonasa-1) tienden a cambiar significativamente en la mayoría de perros infectados con *Ehrlichia canis* (27).

Estudios en perros infectados demuestran que el tratamiento con doxiciclina por 28 días restaura los valores de eritrocitos, plaquetas y la concentración de hemoglobina (5,23).

Química sanguínea. El uso de doxiciclina, tanto en animales infectados por *E. canis* como en animales sanos, demostró disminuir progresivamente la concentración de creatinina sérica que sugiere un efecto nefroprotector (5).

Algunos estudios han descrito, que a altas dosis el uso de doxiciclina puede bajar la tasa de filtración glomerular causando estados de isquemia en la arteriola eferente que puede llegar a inducir el incremento en los valores de creatinina sérica, una de las teorías es la reducción en el estrés oxidativo, disminuyendo los niveles de citoquinas e inhibición de la actividad de metaloproteinasas de matriz (5,30). Se ha determinado en diferentes estudios las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de la doxiciclina asociadas a estos efectos (31,32).

En un estudio con 386 caninos con EMC fue suministrada una dosis oral de doxiciclina cercana a 16 mg/kg/día y se reportó un aumento (bajo niveles normales para la especie y dosis-dependiente) en los niveles de alanino aminotransferasa y fosfatasa alcalina en el 39.4% y el 36.4% de los perros estudiados respectivamente (13). Lo anterior podría indicar que el fármaco no sólo produce alteración en la filtración, como lo describen varios autores, sino que también podría generar alteraciones hepáticas debido a las características lipofílicas y el extenso metabolismo del antibiótico (13).

SISTEMA INMUNE

Globulinas. Posterior al suministro de una dosis de doxiciclina de 10 mg/Kg se ha reportado un incremento de α 2-globulinas en el tratamiento para *Ehrlichia canis*, mientras que las gamma-globulinas muestran una disminución estadísticamente no significativa, esto se atribuye a la baja producción de anticuerpos después de la intervención, de la misma forma se ha demostrado un aumento de la concentración en suero de las B-globulinas que podría estar relacionado con un incremento en los linfocitos B en enfermedad subclínica o crónica (5,7).

The humoral immune response has not been considered a protective mechanism against *Ehrlichia canis* infection. Therefore, the initial increase in B lymphocytes may be related to therapeutic efficacy (36). Additionally, the increase in beta-globulins following doxycycline treatment could be associated with increased B lymphocytes (5).

Major Histocompatibility Complex (MHC).

Following delivery of a dose of oral doxycycline at 10 mg/kg, absolute counts of lymphocytes expressing major class II histocompatibility complex (MHC-II) suggest a direct effect of the active principle on the expression of MHC-II on the surface of peripheral blood lymphocytes. Alterations in the genetic expression of MHC may explain the anti-inflammatory effects of tetracyclines (5).

Studies comprising the expression of MHC class I and II receptors on DH82 (canine cell lines with malignant histiocytoma) cells infected with *Ehrlichia canis*, found that 46.9% of uninfected cells can express MHC-II molecules, while that these receptors were not detected in *Ehrlichia canis*-infected cells (37). This indicates that DH82 canine macrophages cell lines infected with *Ehrlichia canis* are unable to regulate the expression of class II MHC receptors, and suggests the mechanism in which the bacteria could evade the immune system (37).

DOXYCYCLINE PHARMACOKINETICS

In order for doxycycline to exert its bacteriostatic action against *Ehrlichia canis*, a minimum inhibitory concentration should be reached at the plasma level, which in turn is in balance with that obtained in intracellular spaces (Table 2). The pharmacokinetic processes that determine the concentrations reached in the different organic compartments can be summarized as:

Table 2. Minimum inhibiting concentration determined as bacteriostatic level for treatment of microorganisms of the *Anaplasmataceae* family.

MIC for infection by microorganisms of the Anaplasmataceae family				
Model	Microorganism	MIC	Year	Author
Equine, canine, human	<i>A. phagocytophilum</i>	0.03 µg/ml	2003	Maurin M, et al (39)
Invitro	<i>Ehrlichia spp.</i>	0.125 µg/ml	1990	Brouqui P, et al (55)
DH82 cell lines	<i>E. canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> , <i>A. phagocytophilum</i>	0.03 µg/ml	2004	Branger S, et al (56)
Canines	<i>E. canis</i>	0.024 µg/ml	2005	Davoust B, et al (57)

Linfocitos T. En el tratamiento de EMC ha sido reportado un aumento en el recuento de linfocitos T citotóxicos (CD3+ y CD8+) en circulación y nódulos linfáticos (33,34). Sin embargo otros estudios han demostrado que el régimen con doxiciclina disminuye el recuento de linfocitos T citotóxicos, este efecto podría estar relacionado con la actividad antimicrobiana de la doxiciclina (5), sin embargo estas células podrían ser responsables de mecanismos inmunopatológicos causados por la infección (35).

Linfocitos B. Los linfocitos B (CD21+) aumentan luego del tratamiento, sin embargo posterior y de manera gradual disminuyen a valores normales. La respuesta inmune humoral no se ha considerado un mecanismo protector contra la infección por *Ehrlichia canis*, por lo tanto el aumento inicial de linfocitos B podría estar relacionada con la eficacia terapéutica (36). Adicionalmente, el aumento de beta-globulinas luego del tratamiento con doxiciclina podría asociarse con el aumento de los linfocitos B (5).

Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

Después de suministrar una dosis de doxiciclina oral a 10 mg/Kg se ha demostrado la disminución de recuentos absolutos de linfocitos que expresan complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-II), que sugieren un efecto directo del principio activo sobre la expresión de CMH-II en la superficie de linfocitos de sangre periférica. Las alteraciones en la expresión genética de EMC podría explicar los efectos antiinflamatorios de las tetraciclinas (5).

Estudios que comprenden la expresión de receptores del CMH clase I y II en líneas celulares DH82 (líneas celulares caninas con histiocitoma maligno) infectadas con *Ehrlichia canis*, se encontró que el 46.9% de las células no infectadas pueden expresar moléculas del CMH-II, mientras que en las células infectadas con *Ehrlichia canis* no fueron detectados estos receptores (37), lo anterior indica que las líneas celulares de macrófagos caninos DH82 infectadas con *Ehrlichia canis* son incapaces de regular la expresión de receptores de CMH de clase II, y sugiere el mecanismo en el cual la bacteria podría evadir el sistema inmune (37).

FARMACOCINÉTICA DE LA DOXICICLINA

Para que la doxiciclina pueda ejercer su acción bacteriostática frente a *Ehrlichia canis* se debe alcanzar una concentración mínima inhibitoria a nivel plasmático, que a su vez esté en equilibrio con la obtenida en espacios intracelulares (Tabla 2). Los procesos farmacocinéticos que determinan las concentraciones alcanzadas en los distintos compartimentos orgánicos se pueden resumir en:

Absorción. La doxiciclina, a diferencia de otras moléculas de la familia de las tetraciclinas, presenta

Absorption. Doxycycline, unlike other molecules in the tetracycline family, has a greater oral absorption with values ranging from 90-95% due to its high liposolubility (8,12,38). It can also bind to plasma proteins up to $88\pm 5\%$ and has a bioavailability of 93%, therefore it could reach plasma concentrations of 2.8 $\mu\text{g/ml}$ on average (9,12).

Food delays the absorption of doxycycline, therefore it is recommended to supply the medication in the absence of food. However, this can cause lesions on the esophageal and stomach mucosa (36,37,39). In addition, the absorption may be reduced by the presence of divalent or trivalent cations (calcium, magnesium, iron, zinc, aluminum and bismuth as salicylate) which chelate the drug formed an inactive complex (36).

The maximum concentration of doxycycline is detectable within 2 hours after delivery, with serum levels of 1.7 $\mu\text{g/ml}$ to 3 $\mu\text{g/ml}$, which corresponds to relative doses between 5 and 10 mg/kg (5,11).

Distribution. The lipophilic characteristics and the high volume of distribution (>1.0 L/kg) of doxycycline (as well as for other tetracyclines), facilitate a wide distribution throughout the organism (40,41) allowing the accumulation of these substances in various tissues (12,42).

Certain factors, such as protein binding and lipid solubility, influence the passage of tetracyclines from the blood into interstitial space and tissues. (4) The free medication diffuses freely to tissues and liposolubility allows it to pass through membranes. High protein binding causes this pharmaceutical to have a long half-life (15.1 hours) compared to other tetracyclines (43). On the other hand, this active principle can be 5 times more liposoluble than oxytetracycline, a property that allows it to cross the cell membrane easily (43,44).

Clearing. Clearance is defined as the volume of plasma that is purified from one drug per unit of time (37). The metabolism of doxycycline, like other tetracyclines, is due to an oxidation at the level of the cytochrome p450 hepatic enzyme complex that allows its renal and/or hepatic excretion (8,9,45). Bile duct doxycycline may have enterohepatic recirculation that prolongs its half-life in the body by delaying its metabolism. In fact, it has been reported that the half-life of doxycycline is 16 ± 6 hours. Therefore, its average time is higher than the other tetracyclins, which could influence its therapeutic action and posology around 24 hours

una mayor absorción por vía oral con valores en un rango del 90-95% debido a su alta liposolubilidad (8,12,38). También puede llegar a unirse a proteínas plasmáticas hasta un $88\pm 5\%$ y tener una biodisponibilidad del 93%, por lo tanto podría llegar a alcanzar concentraciones plasmáticas de 2.8 $\mu\text{g/ml}$ en promedio (9,12).

Los alimentos retardan la absorción de la doxiciclina, por lo tanto se recomienda suministrar el medicamento en ausencia de comida. Sin embargo esto puede causar lesiones sobre la mucosa esofágica y estomacal (36,37,39). Adicionalmente la absorción podría reducirse por la presencia de cationes divalentes o trivalentes (calcio, magnesio, hierro, zinc, aluminio y el bismuto como salicilato) los cuales quelan el fármaco formado un complejo inactivo (36).

La concentración máxima de doxiciclina, es detectable a las 2 horas después de ser suministrada, encontrándose niveles séricos de 1.7 $\mu\text{g/ml}$ a 3 $\mu\text{g/ml}$, lo cual corresponde a dosis relativas entre 5 a 10 mg/kg (5,11).

Distribución. Las características lipofílicas y el alto volumen de distribución (>1.0 L/Kg) de la doxiciclina (así como para otras tetraciclinas) facilitan una amplia distribución por todo el organismo (40,41) que permite la acumulación de estas sustancias en diversos tejidos (12,42).

Algunos factores como la unión a proteínas y solubilidad lipídica influyen en el paso de las tetraciclinas desde la sangre hasta el espacio intersticial y los tejidos, (El fármaco libre se difunde libremente a los tejidos y la liposolubilidad le permite atravesar membranas) (4). La alta unión a proteínas hace que este fármaco tenga un tiempo de vida medio largo (15.1 horas) en comparación con otras tetraciclinas (43). Por otro lado, este principio activo puede ser 5 veces más liposoluble que la oxitetraciclina, propiedad que le permite atravesar con facilidad la membrana celular (43,44).

Aclaramiento. El aclaramiento se define como el volumen del plasma que es depurado de un fármaco por unidad de tiempo (37). El metabolismo de la doxiciclina, al igual que las demás tetraciclinas, se da por una oxidación a nivel del complejo enzimático citocromo p450 hepático que permite su excreción renal y/o hepática (8,9,45). Por vía biliar la doxiciclina puede tener recirculación enterohepática que prolonga su vida media en el cuerpo al retrasar su metabolismo, de hecho, se ha reportado que la vida media de la doxiciclina es de 16 ± 6 horas, por lo tanto su tiempo medio es superior al de las demás tetraciclinas, lo que podría influir en su acción terapéutica y posología cercana a las 24 horas (8,9,43). Otros autores (5) indican que la vida media de la doxiciclina se encuentra en el rango entre 16-18 horas dependiente de la concentración plasmática (el uso de doxiciclina cada 12

(8,9,43). Other authors (5) indicate that the half-life of doxycycline is in the range of 16-18 hours depending on the plasma concentration (the use of doxycycline every 12 hours can be considered therapeutically viable).

Elimination. Doxycycline, unlike other tetracyclines, can be eliminated by mechanisms other than the renal route. Concentrations of doxycycline in bile close to 50 µg/ml (25 times higher than plasma concentrations obtained) (42). The elimination of doxycycline by the urinary route is 20%, 75% of the doxycycline passes from the blood to the intestinal lumen by passive diffusion, and another 5% from the bile and is then excreted in the faeces (9,12, 46).

The elimination half-life ($t_{1/2e}$) is the time it takes for the plasma concentration of a medication to be reduced by half and is inversely related to the elimination constant, so the faster the elimination of the component, the greater the Elimination constant (K_e) and smaller elimination half-life (36).

$$t_{1/2e} = 0.693/K_e$$

The reported half-life of doxycycline in dogs is 16-18 hours (8-10,47) with an elimination rate using doses of 10 mg/kg is 5.65 ± 2.76 mL/kg/min (339mL/kg/Hour) (46). However, in studies with 6 dogs using intravenous doxycycline hyclate at a dose of 5 mg/kg body weight, a $t_{1/2e}$ of 10.36 hours was obtained (38). On the other hand, using oral doxycycline polyphosphate at 10 mg/kg was reported in a group of 4 canine individuals with a $t_{1/2e}$ between 10.7 and 11.8 hours (48). The clearance data indicates that the rate is about 1.7 mL/kg/min (102 mL/kg/hr), which should be taken into account when using a drug encapsulated in a microencapsulated system, as lower values may indicate a bioaccumulation process. Some authors consider that this storage could affect the rate of glomerular filtration and lead to hepatic overload (and consequently a possible insufficiency of this organ) (8,12,42). The pharmacokinetic criteria obtained after the administration of intravenous doxycycline has been reported in different studies obtaining similar results (Table 3).

DOXYCYCLINE HYCLATE IN THE EXPERIMENTAL TREATMENT OF CANINE EHRLICHIOSIS

Although several studies have addressed the therapeutic efficacy of tetracycline hydrochloride or HD for the treatment of *Ehrlichia canis* infection in dogs, the efficacy of these drugs remains controversial (49,50).

horas se puede considerar terapéuticamente viable).

Eliminación. La doxiciclina, a diferencia de otras tetraciclinas, puede eliminarse por mecanismos diferentes a la vía renal. Han sido reportadas concentraciones de doxiciclina en bilis cercanas a 50 µg/ml (25 veces superior a concentraciones plasmáticas obtenidas) (42). La eliminación de la doxiciclina por vía urinaria es del 20%, el 75% de la doxiciclina pasa desde la sangre hacia el lumen intestinal por difusión pasiva, y otro 5% desde la bilis para luego ser excretada por las heces (9,12,46).

El tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2e}$) es el tiempo que tarda la concentración plasmática de un fármaco en reducirse a la mitad y es inverso a la constante de eliminación, así cuanto más rápida sea la eliminación del fármaco, mayor será la constante de eliminación (K_e) y más pequeña será su vida media de eliminación (36).

$$t_{1/2e} = 0.693/K_e$$

En perros la vida media reportada de la doxiciclina es de 16-18 horas (8-10,47) con una tasa de eliminación usando dosis de 10 mg/kg es de 5.65 ± 2.76 mL/kg/min (339 mL/kg/hora) (46), sin embargo en estudios realizados en 6 perros usando hiclato de doxiciclina intravenoso a una dosis de 5 mg/Kg de peso se obtuvo un $t_{1/2e}$ de 10.36 horas (38). Por otro lado, usando polifosfato de doxiciclina oral a 10 mg/Kg se reportó en un grupo de 4 ejemplares caninos un $t_{1/2e}$ entre 10.7 y 11.8 horas (48). Los datos de la depuración indican que la tasa es de alrededor de 1.7 mL/kg/min (102 mL/kg/hora), lo cual debe tenerse en cuenta cuando se usa un fármaco encapsulado en un sistema microencapsulado, pues valores inferiores podrían ser indicativos de procesos de bioacumulación. Algunos autores consideran que dicho almacenamiento podría afectar la tasa de filtración glomerular y conllevar a una sobrecarga hepática, (y como consecuencia una posible insuficiencia del mismo órgano) (8,12,42). Los criterios farmacocinéticos obtenidos luego de la administración de doxiciclina intravenosa han sido reportados en diferentes estudios obteniendo resultados similares (Tabla 3).

DOXYCYCLINA HICLATO EN EL TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE LA EHRLICHIOSIS CANINA

A pesar que varios estudios han abordado la eficacia terapéutica de hidrocloreuro de tetraciclina o HD para el tratamiento de la infección por *Ehrlichia canis* en perros, la eficacia de estos fármacos sigue siendo controvertida (49,50).

Breitschwerdt et al (50) evaluaron la eficacia de HD oral para el tratamiento de la Ehrlichiosis aguda. Para dicho estudio 8 perros fueron infectados experimentalmente con dosis de 5.6 mg/Kg y 6 mg/

Table 3. Pharmacokinetic aspects after administration of intravenous doxycycline in canine specimens: T1/2a mean distribution half-life, T1/2b mean elimination half-life, Vd (ss) steady-state distribution volume, Vc Central compartment volume, PB Protein binding percentage, CI Clarification, AUC 0-∞ Area under curve from 0 to infinity.

Pharmacokinetic criteria obtained after intravenous administration in dogs				
Pharmacokinetic criteria	Unit	Riond (3) 5mg/kg	Bidgood (46) 10mg/ml	Gutierrez (11) 10mg/Kg
T1/2a	Hours	0.25 +/- 0.04	0.08 +/- 0.05	0.28 +/- 0.01
Vd(ss)	L/Kg	0.93 +/- 0.14	0.65 +/- 0.08	11.34 +/- 1.34
T1/2b	Hours	6.99 +/- 1.09	4.56 +/- 0.57	7.44 +/- 0.06
Vc	L/Kg	0.34 +/- 0.05	Not reported	6.37 +/- 0.76
CI	ml/min/Kg	1.72 +/- 0.17	1.66 +/- 2.21	2.23 +/- 0.13
PB	%	91.40 +/- 0.93	91.75 +/- 0.63	Not reported
AB	%	53.87 +/- 5.18	Not reported	Not reported
AUC 0 - ∞	h*µg/ml	Not reported	12.09 +/- 3.22	97.34 +/- 7.45

Breitschwerdt et al (50) evaluated the efficacy of oral HD in the treatment of acute Ehrlichiosis. 8 dogs were experimentally infected with doses of 5.6 mg/kg and 6 mg/kg, in this study, twice a day for 14 days (two study groups). The result obtained was the non-amplification of gene segments for *Ehrlichia canis* after the treatment. In this case, doxycycline appears to have been uniformly effective in eliminating the infection in treated dogs (50). However, a study that included the use of doxycycline in canine specimens classified in the 3 phases of CME (acute, subclinical and chronic) at a dose of 10 mg/kg per day for 28 days, reported 8 dogs in the acute and subclinical phase of CME that did not show amplified gene segments for *Ehrlichia canis* by PCR. However there was an intermittent persistence of bands in the electrophoresis of two individuals with chronic Ehrlichiosis and in ticks that were experimentally fed (51). Another study evaluated the persistence of *Ehrlichia canis* in 5 dogs treated with doxycycline for 7 days at a dose of 10 mg/kg per day, and the amplification of DNA segments of the bacteria in blood, kidney, lymph nodes, liver and spleen in 3 specimens of the 5 dogs studied was determined. However, in this investigation, in a group of 8 dogs treated for 14 days, no positive results were observed for *Ehrlichia canis* by PCR (49). The results of these investigations confirm the efficacy of doxycycline to counteract the acute and subclinical CME of the disease. Several studies indicate that *Ehrlichia canis* may persist in clinically normal dogs, even after a broad regimen of doxycycline treatment (49,51)

THERAPEUTIC PERSPECTIVES

Different publications show the need to delve into clinical trials to determine the possible causes of post-treatment CME flare-ups in the tetracycline family. Persistent *Ehrlichia canis* infections are an indicator of the importance of continued

Kg, dos veces al día durante 14 días (dos grupos de estudio). El resultado obtenido fue la ausencia de amplificación de segmentos de genes para *Ehrlichia canis* después del tratamiento instaurado. En este caso la doxiciclina parece haber sido uniformemente efectiva en la eliminación de la infección en los perros tratados (50). Sin embargo se reportó en un estudio que comprendió el uso de doxiciclina en ejemplares caninos clasificados en las 3 fases de la EMC (aguda, subclínica y crónica) a una dosis de 10 mg/Kg al día por 28 días. A 8 perros en fase aguda y subclínica de EMC no les fueron amplificadas segmentos de genes para *Ehrlichia canis* por PCR, sin embargo hubo persistencia intermitente de bandas en la electroforesis en dos ejemplares con Ehrlichiosis crónica y en garrapatas que fueron alimentadas con estos de manera experimental (51). En otro estudio se evaluó la persistencia de *Ehrlichia canis* en 5 perros tratados con doxiciclina durante 7 días a una dosis de 10 mg/kg al día, y se pudo determinar la amplificación de segmentos de DNA de la bacteria en sangre, riñón, nódulos linfáticos, hígado y bazo en 3 ejemplares de los 5 perros estudiados, sin embargo en esta investigación en un grupo de 8 perros tratados por 14 días no se observaron resultados positivos a *Ehrlichia canis* por PCR (49). Los resultados de estas investigaciones confirman la eficacia de la doxiciclina para contrarrestar la EMC en fase aguda y subclínica de la enfermedad. Diversos estudios indican que *Ehrlichia canis* puede persistir en perros clínicamente normales, incluso después de un amplio régimen de tratamiento con doxiciclina (49,51).

PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS

Diferentes publicaciones demuestran la necesidad de ahondar en los ensayos clínicos con el fin de determinar las posibles causas del recrudescimiento de la EMC posterior a los tratamientos con fármacos de la familia de las tetraciclinas. Las infecciones persistentes de *Ehrlichia canis* son un indicador sobre la importancia en la supervisión clínica continua, inclusive después de una respuesta al tratamiento con

clinical monitoring, including after a response to antibiotic treatment. All dogs used in studies with experimental infections show signs of acute severe CME, and blood parameters usually return to normal levels after doxycycline treatment. The study of the use of new formulations (microencapsulated or nanostructures) is also important. This is in reference to the treatment to counteract the presence of *Ehrlichia canis* in canine patients (Investigation with products coated with liposomes, biopolymers, biopolymers, drug delivery systems of doxycycline, etc.), which provide greater specificity and effectiveness in treatment, and an evident decrease in the multiple undesirable effects, typical of this type of antibiotic. New strategies in pharmaceutical pharmaceutical technology could favor the controlled release of the medication, increase its half-life, distribution and the bioavailability necessary to produce bacteriostatic effects where optimal therapeutic action and medical resolution of the canine patient.

antibióticos. Todos los perros utilizados en los estudios con infecciones experimentales muestran signos de EMC severa aguda, y por lo general los parámetros sanguíneos regresan a los niveles normales después del tratamiento con doxiciclina. Es importante, de igual manera, ahondar en el estudio respecto al uso de nuevas formulaciones (microencapsulados o nanoestructurados) en referencia al tratamiento para contrarrestar la presencia de *Ehrlichia canis* en el paciente canino (Investigación con productos recubiertos con liposomas, biopolímeros, sistemas de liberación controlada de doxiciclina, etc) que brinden una mayor especificidad y efectividad en el tratamiento, y una disminución evidente de los múltiples efectos indeseables propios de este tipo de antibióticos. Las nuevas estrategias en el área de la tecnología farmacéutica podrían favorecer la liberación controlada del fármaco, el aumento de la vida media, la distribución y la biodisponibilidad necesaria para producir efectos bacteriostáticos en donde se garantice una acción óptima terapéutica y una resolución médica del paciente canino.

REFERENCIAS

1. Aronson AL. Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *J Am Vet Med Assoc* 1980; 176(10):1061-8.
2. Cunha, B.A. Sibley, C.M. Ristuccia AM. Doxyxycline. *Ther Drug Monit* 1982; 4(2):115.
3. Riond JL, Vaden SL, Riviere JE. Comparative Pharmacokinetics of Doxycycline in Cats and Dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 1990; 13(4):415-24.
4. Barza M, Brown RB, Shanks C, Gamble C, Weinstein L. Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline, and oxytetracycline in dogs. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 8(6):713-20.
5. Villaescusa A, García-Sancho M, Rodríguez-Franco F, Tesouro MÁ, Sainz Á. Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet J* 2015; 204(3):263-8.
6. Von Wittenau, M.S. Yeary R. The excretion and distribution in body fluids of tetracyclines after intravenous administration to dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1963; 140(2):258-66.
7. Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med* 2002; 16(3):309-15.
8. Sumano H, Ocampo L. Tetraciclinas. *Farmacología veterinaria*. México: MC Graw Hill; 2006.
9. Chambers HE. Inhibidores de la síntesis de proteína y otros antibacterianos. En: Laurence L. Brunton(Ed). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Undécima e. México: MC Graw Hill; 2008.
10. Vicente D, Pérez-Trallero E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28(2):122-30.
11. Gutiérrez L, Velasco Z, Vázquez C, Vargas D, Sumano H. Pharmacokinetics of an injectable long-acting formulation of doxycycline hyclate in dogs. *Acta Vet Scand* 2012; 54(1):1.

12. Deck DH, Winston LG. Tetracyclines, Macrolides, Clindamycin, Chloramphenicol, Streptogramins, & Oxazolidinones. In: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (editor). Basic & clinical pharmacology. Vol 12. 2012.
13. Schulz BS, Hupfauer S, Ammer H, Sauter-Louis C, Hartmann K. Suspected side effects of doxycycline use in dogs - a retrospective study of 386 cases. *Vet Rec* 2011; 169(9):229.
14. Bartlett JG, Bustetter LA, Gorbach SL, Andrew B. Comparative Effect of Tetracycline and Doxycycline on the Occurrence of Resistant *Escherichia coli* in the Fecal Comparative Effect of Tetracycline and Doxycycline on the Occurrence of Resistant *Escherichia coli* in the Fecal Flora 1975; 7(1):55-7.
15. Little SE. Ehrlichiosis. In: *Arthropod Borne Diseases*. Springer International Publishing; 2017.
16. Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1078:110-7.
17. Bouza-mora L, Dolz G, Solórzano-morales A, Romero-zu JJ, Salazar-sánchez L, Labruna MB, et al. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. *Ticks Tick Borne Dis* 2017; 8(1):36-40.
18. López, J. Rivera, M. Concha, J. C. Gatica, S. Loeffeholz, M. Barriga O. Ehrlichiosis humana en Chile: evidencia serológica. *Rev Med Chil* 2003; 131(1):67-70.
19. Vargas-Hernandez, G., André, M. R., Cendales, D. M., Sousa, K. C. M. D., Gonçalves, L. R., Rondelli., Zacarías-Machado, R., Tinucci-Costa M. Molecular detection of *Anaplasma* species in dogs in Colombia. *Braz J Vet Parasitol* 2016; 25(4):459-64.
20. Nair ADS, Cheng C, Ganta CK, Sanderson MW, Alleman R, Munderloh UG, et al. Comparative Experimental Infection Study in Dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. *PLoS One* 2016;11(2):1-21.
21. Miranda J, Mattar S. Molecular detection of *Anaplasma* sp. and *ehrlichia* sp. in ticks collected in domestical animals, Colombia. *Trop Biomed* 2015;32(4):726-35.
22. Waner T, Harrus S, Jongejan F, Bark H, Keysary A, Cornelissen AWCA. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol* 2001; 95(1):1-15.
23. Casas EA. Seroprevalencia de la dirofilariosis y ehrlichiosis canina en tres distritos de Lima. *Rev Inv Vet Peru* 2003;14(1):43-8.
24. Swann JW, Woods K, Wu Y, Glanemann B, Garden OA. Characterisation of the Immunophenotype of Dogs with Primary Immune-Mediated Haemolytic Anaemia. *PLoS One* 2016; 11(2):1-18.
25. McCullough S. Immune-mediated hemolytic anemia : understanding the nemesis. *Vet Clin North Am Small Anim Pr* 2003; 33:1295-315.
26. Ge, Y., Yin, H., Rikihisa, Y., Pan, W., & Yin H. Molecular Detection of Tick-Borne Rickettsiales in Goats and Sheep from Southeastern China. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2016; 16(5):309-16.
27. Karnezi D, Ceron JJ, Theodorou K, Leontides L, Siarkou VI, Martinez S, et al. Acute phase protein and antioxidant responses in dogs with experimental acute monocytic ehrlichiosis treated with rifampicin. *Vet Microbiol* 2016; 184:59-63.
28. Little SE. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* 2010; 40(6):1121-40.
29. Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* : subversive manipulators of host cells. *Nat Publ Gr* 2010; 8(5):328-39. DOI: [dx.doi.org/10.1038/nrmicro2318](https://doi.org/10.1038/nrmicro2318)
30. Kucuk A, Kabadere S, Tosun M, Koken T, Kinaci MK, Isikli B, et al. Protective effects of doxycycline in ischemia/reperfusion injury on kidney. *J Physiol Biochem* 2009; 65(2):183-91.
31. Gabler, W.L. Creamer HR. Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines. *J Periodontal Res* 1991; 26(1):52-8.
32. Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines : a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299(3):C539-48

33. Frank JR, Breitschwerdt EB. A Retrospective Study of Ehrlichiosis in 62 Dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med* 1999; 13(3):194-201.
34. De Castro MB, Machado RZ, De Aquino LPCT, Alessi AC, Costa MT. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: Clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol* 2004; 119(1):73-86.
35. Ismail N, Crossley EC, Stevenson HL, Walker DH. Relative Importance of T-Cell Subsets in Monocytotropic Ehrlichiosis : a Novel Effector Mechanism Involved in Ehrlichia -Induced Immunopathology in Murine Ehrlichiosis. *Infect Immun* 2007; 75(9):4608-4620
36. Winslow GM, Yager E, Shilo K, Volk E, Reilly A, Chu FK. Antibody-Mediated Elimination of the Obligate Intracellular Bacterial Pathogen Ehrlichia chaffeensis during Active Infection. *Infect Immun* 2000; 68(4):2187-2195.
37. Harrus S, Waner T, Friedmann-morvinski D. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells , following infection with Ehrlichia canis. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 96(3-4):239-43.
38. Wilson RC, Kemp DT, Kitzman J V., Goetsch DD. Pharmacokinetics of doxycycline in dogs. *Can J Vet Res* 1988; 52(1):12-4.
39. Maurin M, Bakken JS, Dumler JS. Antibiotic susceptibilities of Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum strains from various geographic areas in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(1):413-5.
40. Collins, S.P. Labelle, A.L. Dirikolu, L. Li, Z. Mitchell, M.A. Hamor RE. Tear film concentrations of doxycycline following oral administration in ophthalmologically normal dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2016; 249(5):508-14.
41. Arciniegas-Ruiz SM, Gutiérrez-Olvera L, Bernad-Bernad MJ, Caballero-Chacón SDC, Vargas-Estrada D. Comparative pharmacokinetics of a new oral long-acting formulation of doxycycline hyclate: A canine clinical trial. *Eur J Pharm Sci* 2015; 80:9-15. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.012
42. Vicente D, Pérez-Trallero E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28(2):122-30.
43. Armijo JA. Absorción, distribución y eliminación de los fármacos. In: editor. *Farmacología humana*. Barcelona: Masson S.A: 1997.
44. Perez-Trallero E, Iglesias L. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28(2):122-30.
45. Riond J, Riviere JE. Doxycycline binding to plasma albumin of several species. *J Vet Pharmacol Ther* 1989; 12(3):253-260.
46. Bidgood TL, Papich MG. Comparison of plasma and interstitial fluid concentrations of doxycycline and meropenem following constant rate intravenous infusion in dogs. *Am J Vet Res* 2003; 64(8):1040-6.
47. Passalidou, P. Giudicelli, H. Moreigne, M. Khalfi A. Un cas d'ulcère œsophagien secondaire à la prise de doxycycline. *Arch Pédiatrie* 2006; 13(1):90-1.
48. Michel, G. Mosser, J. Fauran AU. Serum kinetics of doxycycline polyphosphate in dogs. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1979; 1:43-48.
49. Iqbal ZRY. Reisolation of Ehrlichia canis from Blood and Tissues of Dogs after Doxycycline Treatment. *J Clin Microbiol* 1994; 32(7):1644-9.
50. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI, Carolina N, Carolina N. Doxycycline Hyclate Treatment of Experimental Canine Ehrlichiosis Followed by Challenge Inoculation with Two Ehrlichia canis Strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(2): 362-368.
51. McClure JC, Crothers ML, Schaefer JJ, Stanley PD, Needham GR, Ewing SA, et al. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(12):5012-20.
52. Chiers K, Weyens P, Deprez P, Heerden M van, Meulemans G, Baert K, et al. Lingual and pharyngeal paralysis due to acute doxycycline intoxication in veal calves. *Vet Rec* 2004;155(1):25-6.

53. Riond J, Riviere JE, Duckett WM, Atkins CE. Cardiovascular effects and fatalities associated with intravenous administration of doxycycline to horses and ponies. *Equine Vet J* 1992;24:41-5.
54. Schölkens, B. Gerhards, H. Lindner E. Circulatory effects of intravenously administered rolitetracycline and other tetracyclines in animal experiments. *Arzneimittelforschung* 1971; 24(3):312-7.
55. Brouqui P, Raoult D. In vitro susceptibility of *Ehrlichia sennetsu* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(8):1593-6.
56. Branger S, Rolain JM, Raoult D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by real-time PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12):4822-8.
57. Davoust B, Keundjian A, Rous V, Maurizi L, Parzy D. Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline. *Vet Microbiol* 2005;107(3-4):279-83.